PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-292792
(43)Date of publication of application : 23.10.2001

(51)Int.Cl.
C12P 19/26
B01D 15/08
B01J 20/26
//(C12P 19/26
C12R 1:685)
(C12P 19/26
C12R 1:80)

(21)Application number : 2000-112406
(22)Date of filing : 13.04.2000

(71)Applicant : SEIKAGAKU KOGYO CO LTD
(72)Inventor : SUZUKI KIYOSHI
TATEBAYASHI SADAO

(54) METHOD FOR RECOVERING N-ACETYLGLUCOSAMINE

(57)Abstract:
PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for recovering N-acetylglucosamine from an N-acetylglucosamine solution containing glucose in which the N- acetylglucosamine with a low glucose content usable for synthesizing substances on an industrial scale using the N-acetylglucosamine as a raw material can simply be recovered.

SOLUTION: This method for removing the glucose from the N- acetylglucosamine solution containing the glucose and recovering the N- acetylglucosamine is characterized by treating the solution with a glucose oxidase and separating and removing a glucose oxidase reactional product from the treated solution. The cost can be reduced by reutilizing the recovered N-acetylglucosamine and the method is useful for environments.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]This invention relates to the method of collecting N-acetyl glucosamines from the N-acetyl glucosamine solution containing glucose.

[0002]

[Description of the Prior Art]N-acetyl glucosamine is widely distributed as constituents, such as glycoconjugate of animals and plants or a microorganism especially a kitchen, glycosaminoglycan, glycoprotein, and a glycolipid.

[0003]N-acetyl glucosamine is used as synthetic powder of N-acetyl lactosamine. N-acetyl lactosamine is a biochemical very important disaccharide which exists in the sugar chain of human milk oligosaccharide, lipopolysaccharide, various glycoprotein, and a glycolipid. It has the propagation activity of lactobacillus bifidus which is a kind of enterobacilli, and since the outstanding ready intestines operation is shown, use to advanced protective foods like special formula powdered milk for puericulture attracts attention.

It is observed as synthetic powder, such as a sialyl Le^X sugar chain which attentions have furthermore gathered also for the physiology activity of the glycoconjugate sugar chain containing N-acetyl lactosamine in recent years, for example, has cell adhesion inhibiting activities.

[0004]As a method of compounding this N-acetyl lactosamine, although the chemosynthesis method and the enzyme synthetic method are known, Since the quality of an object is obtained at the reaction of a single step, research of the enzyme synthetic method which uses **-galactosidase or galactosyltransferase chiefly as a synthetic method in a commercial scale is made widely. Among these, many of enzyme synthetic methods which use **-galactosidase are methods of using the substrate containing N-acetyl glucosamine and lactose as reaction raw materials. Reaction by-products, such as glucose, exist in unreacted N-acetyl glucosamine, unreacted lactose, and it with N-acetyl lactosamine generated in the reaction mixture after the end of an enzyme reaction using this substrate. To collect N-acetyl glucosamines from this reaction mixture efficiently, and to reuse as reaction raw materials is desired for the cost reduction of an environmental measure or N-acetyl lactosamine manufacture by a commercial scale.

[0005]It is known that glucose shows the operation which checks the galactose transfer activity of **-galactosidase, In order to reuse the collected N-acetyl glucosamine to N-acetyl lactosamine manufacture, it is necessary to obtain high grade N-acetyl glucosamine with glucose content low as much as possible.

[0006]However, in the chromatography of activated carbon, a cerite column, etc. which are used conventionally available on a scale of industrial. It is difficult to separate the N-acetyl glucosamine which are monosaccharides, and glucose, and about 20% of glucose is contained in the N-acetyl glucosamine fraction which actually carried out fractionation with activated carbon and a cerite column from the reaction mixture obtained by the above-mentioned N-acetyl lactosamine manufacture. In order to remove this glucose further and to obtain N-acetyl glucosamine with low glucose content to a grade recyclable to enzyme composition of the above-mentioned N-acetyl lactosamine, etc., more complicated refining operation and an expensive refining material are needed.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]Therefore, this invention is the method of collecting N-acetyl glucosamines from the N-acetyl glucosamine solution containing glucose. The purpose is to be able to collect N-acetyl glucosamines with low glucose content usable to the substance composition by the commercial scale which uses N-acetyl glucosamine as a raw material at low cost simple, and to provide a useful method to environment moreover.

[0008]

[Means for Solving the Problem]If this invention persons make glucose oxidase act on an N-acetyl glucosamine solution containing glucose as a result of repeating research wholeheartedly, in order to attain an aforementioned problem and glucose is selectively changed into gluconic acid, Usually, it finds out that high grade N-acetyl glucosamine is obtained simply using a separation method used, and came to complete this invention.

[0009]Therefore, this invention is the method of removing glucose from an N-acetyl glucosamine solution containing glucose, and collecting N-acetyl glucosamines, and said solution is processed by glucose oxidase, A method of carrying out separation removal of the glucose oxidase resultant from what was processed in this way is provided.

[0010]As an N-acetyl glucosamine solution containing glucose used for a method of above-mentioned this invention, a reaction mixture obtained in enzyme composition of N-acetyl lactosamine which uses lactose and N-acetyl glucosamine as a substrate can be used preferably.

[0011]When collecting N-acetyl glucosamines from a reaction mixture obtained in enzyme composition of the above-mentioned N-acetyl lactosamine, this reaction mixture, It is preferred after an enzyme synthetic reaction that separation removal of the N-acetyl lactosamine is carried out at least, and it is most preferred that it is a fraction which consists of monosaccharide isolated preparatively after an enzyme synthetic reaction.

[0012]As glucose oxidase used for a method of above-mentioned this invention, Glucose oxidase from microorganism belonging to an Aspergillus group or a Penicillium group can be used preferably, and glucose oxidase originating in especially Aspergillus niger can be used preferably.

[0013]In an above-mentioned this invention method, it is preferred by carrying out glucose oxidase processing of said solution to change glucose into gluconic acid, to carry out separation removal of the gluconic acid from this treating solution by anion-exchange-resin processing, and to collect N-acetyl glucosamines.

[0014]The above-mentioned glucose can be changed into gluconic acid, and purity can obtain not less than 90% of N-acetyl glucosamine in this invention method of carrying out separation removal of the gluconic acid from a solution by anion-exchange-resin processing, and collecting N-acetyl glucosamines.

[0015]A manufacturing method of N-acetyl lactosamine making N-acetyl glucosamine and lactose which were obtained by an above-mentioned this invention method react under **-galactosidase existence as another gestalt of this invention is provided.

[0016]It is made to react under existence of an enzyme which has the operation which transfers galactose residue for N-acetyl glucosamine and lactose to N-acetyl glucosamine from lactose, and generates N-acetyl lactosamine, A monosaccharide fraction which contains N-acetyl glucosamine and glucose by carrying out activated carbon treatment of this reaction mixture is obtained, A method of carrying out glucose oxidase processing of this fraction, carrying out separation removal of the generated gluconic acid, and obtaining N-acetyl glucosamine can be provided, A manufacturing method of N-acetyl lactosamine adding lactose in a solution containing N-acetyl glucosamine obtained by this, and presenting the above-mentioned N-acetyl lactosamine synthetic reaction is provided.

[0017]

[Embodiment of the Invention]This invention is explained still in detail below. The N-acetyl glucosamine solution containing the glucose used for the method of this invention should just be a solution which contains both at least, and in particular the manufacturing method or the origin of a solution are not limited. As for such a solution, it is preferred that it is a solution containing more N-acetyl glucosamines than glucose.

[0018]The reaction mixture obtained as such a solution in manufacture of N-acetyl lactosamine by the enzyme composition which uses lactose and N-acetyl glucosamine as a substrate, for example can be mentioned. With this reaction mixture, if obtained in manufacture of N-acetyl lactosamine by this enzyme composition, it will not be limited. Usually, although it is a solution, the thing of a solid state which removed the solvent from the solution may be used. In manufacture of N-acetyl lactosamine by this enzyme composition, The enzyme which has the operation which transfers galactose residue to N-acetyl glucosamine from lactose is made to specifically act on lactose and the substrate solution containing N-acetyl glucosamine, and N-acetyl lactosamine is compounded. The solution containing N-acetyl glucosamine and glucose can usually be obtained with the ion chromatography method, a gel filtration separation method, etc. after ending reaction by isolating only an OK and monosaccharide fraction preparatively for the solution which carried out judgment removal of the N-acetyl lactosamine. Such a monosaccharide fraction usually contains an about [70-90 mol %] N-acetyl glucosamine, and about [10-30 mol %] glucose.

[0019]As an enzyme which is used in enzyme composition of the above-mentioned N-acetyl lactosamine and which has the operation which transfers galactose residue to N-acetyl glucosamine from lactose, If it has such a catalysis, the existence gestalt or origin will not be limited and not only the enzyme what is called itself, such as refining enzymes and a partial purification enzyme, but a resting-bacterium object, a dried cell, biomass debris, etc. containing this enzyme will be a category of the enzyme in this invention, for example. As such an enzyme, specifically Bacillus group microorganisms, such as Bacillus circulans, Rhodotorula group microorganisms, such as Rhodotorula minuta and Rhodotorula lactosa, Although the refining enzymes, partial purification enzymes, or enzyme preparation things of **-galactosidase originating in Sterigmatomyces group microorganisms, such as Sterigmatomyces elviae, are mentioned, In particular, high **-galactosidase of the singularity over beta-1 of Bacillus circulans origin and 4 glycosidic linkages is preferred.

[0020]Said enzyme may be manufactured with the gene engineering technique of making grow and refining [extract and] the recombination cell etc. which introduced gene DNA which may be extracted and refined from the natural product of the microorganism etc. which have said enzyme production ability, or encodes said enzyme. Said enzyme may be polypeptide including the active site of the enzyme which has a galactose transfer reaction, and such polypeptide can be manufactured with the gene engineering technique.

[0021]Although the conditions in particular of the above-mentioned enzyme synthetic reaction are not limited, and can be performed according to conditions publicly known as a reaction condition of the synthetic enzyme to be used and a person skilled in the art can choose suitably, it is preferred to react under the optimal pH of the enzyme to be used and optimum temperature conditions. Unless the reaction by the enzyme to be used is affected also about substrate mixtures, such as a solution containing a substrate, it is not limited, but it is preferred that it is a mixture in buffer solution.

[0022]The obligatory means of an enzyme reaction can be adopted and what is necessary is just to make a substrate and an enzyme act in the state where an enzyme reaction advances, as a reaction gestalt. For example, an enzyme may be contacted to a substrate solution, and such an enzyme that the reverse may be sufficient as and is used is fixed to a suitable carrier, and the method of contacting a substrate solution can also be adopted. It is also possible to more specifically fix the enzyme to be used in a bead-like carrier, for example, to fill up a column, and to compound lactose and the mixture of N-acetyl glucosamine in succession with through. Immobilized enzyme is added to a substrate solution, the catalytic reaction of both is fully carried out by stirring etc., and the batch method of separating immobilized enzyme after a reaction can also be adopted.

[0023]Thus, glucose, galactosyl N-acetyl lactosamine, etc. which are the N-acetyl glucosamine, lactose, and the by-product which are unreacted substrates besides N-acetyl lactosamine which is the quality of an object of the reaction by said enzyme are contained in the obtained reaction mixture.

[0024]The method of isolating a monosaccharide fraction preparatively from this reaction mixture will not be limited especially if it is the method that a monosaccharide fraction can be isolated preparatively. For example, perform preliminary refining of slack, decolorization, a demineralization step by ion-exchange resin, etc., etc. to a reaction mixture if needed, and when the concentration of an ingredient is low. A separation method by the chromatography using strongly acidic cation exchange resin since it processes condensing under decompression furthermore etc., A monosaccharide fraction can be easily isolated preparatively by publicly known methods, such as an adsorption chromatography method using adsorbent, such as a gel filtration separation method, a molecular sieve method, activated carbon, a cerite (trade name) column.

[0025]As an example, the preparative isolation method by activated carbon and a cerite column is explained still in detail. Said 2 to 6% (W/V) of synthetic reaction mixture of the capacity of column is supplied to a column, an eluate is passed in the rate of flow 60 - 200 ml/time, and sugars are made eluted. The monosaccharide fraction containing N-acetyl glucosamine or glucose is eluted with water. If a 20 to 65% (w/w) grade is suitable for the sugar concentration of the end mixture of a synthetic reaction supplied to a column and its concentration is higher than this, it will produce disorder to a separation pattern. In a described method, since N-acetyl lactosamine is eluted with methanol 14 to 20%, it is also possible to separate N-acetyl lactosamine.

[0026]As glucose oxidase used in order to remove glucose from the N-acetyl glucosamine solution containing glucose and to collect N-acetyl glucosamines, The enzyme which it has the operation which changes glucose into gluconic acid, and does not have on N-acetyl glucosamine substantially (with an enzyme here.) it is a concept containing a resting-bacterium object, a dried cell, biomass debris, etc. containing this enzyme besides the enzyme itself, such as refining enzymes and a partial purification enzyme, -- it is -- if -- the origin in particular is not limited. For example, the thing of Aspergillus group origin, such as Aspergillus niger, and the thing of Penicillium group origin, such as Penicillium notatum, are mentioned. Especially the thing of Aspergillus niger origin is preferred.

[0027]This enzyme may be extracted and refined from the natural product of the microorganism etc. which have the productivity of an enzyme which has the operation which changes glucose into gluconic acid, The recombination cell etc. which introduced gene DNA which encodes such an enzyme are grown, and it may be manufactured by the gene engineering techniques, such as extracting and refining. If it has the operation which changes glucose into gluconic acid and N-acetyl glucosamine is not affected substantially, polypeptide including the active site of glucose oxidase may be sufficient, and such polypeptide can be manufactured with the gene engineering technique.

[0028]Although the conditions which perform glucose oxidase processing do not bar the reaction which changes glucose into gluconic acid, and they are not limited unless N-acetyl glucosamine is affected substantially, but a person skilled in the art can choose them suitably, It is preferred to make it react under the optimal pH of the glucose oxidase to be used and optimum temperature conditions. When using the glucose oxidase of Aspergillus niger origin, it is preferred to react at p H 5.7-6.2 and about 30 **.

[0029]This treatment object can be used after processing by glucose oxidase as a supply source of the N-acetyl glucosamine which is a substrate in the generation reaction of N-acetyl lactosamine by enzymatic process. Usually, separation removal of the gluconic acid which is a resultant by glucose oxidase is carried out by the method of publicly known common use from this treatment object containing this N-acetyl glucosamine.

[0030]Also in [generally it is known that gluconic acid exists in solution as an equilibration mixture of glucono 1,4-lactone, glucono-1,5-lactone, and the gluconic acid of isolation, and] this invention, The gluconic acid generated by glucose oxidase exists in solution as an equilibration mixture of glucono 1,4-lactone, glucono-1,5-lactone, and the gluconic acid of isolation. Therefore, in this invention, "gluconic acid" shall be used as a term which also includes such glucono lactone in addition to gluconic acid itself, and, as for the aforementioned separation and removal method, it is preferred that it is the way glucono lactone is also removable.

[0031]The method of carrying out separation removal of the gluconic acid (glucono lactone), and isolating N-acetyl glucosamine preparatively from the solution after glucose oxidase processing will not be limited especially if it is a method by which N-acetyl glucosamine is obtained. For example, a MUROMAKKU Cl^- type (the Muromachi chemical industry, styrene system strongly basic resin which has the 4th class ammonium), Although there are chromatography using anion exchange resin like SA series, such as diagram ion SA10A or 11A, or PA series (Mitsubishi Chemical, styrene system strongly basic resin which has the 4th class ammonium), and an electrodialysis process, The method of carrying out adsorption treatment of the gluconic acid with the chromatography especially using anion exchange resin, and obtaining the N-acetyl glucosamine which is a non-adsorbing fraction is simple, and preferred.

[0032]As for not less than 90% of purity, by this invention method, not less than 95% of N-acetyl glucosamine is obtained preferably.When performing this invention method combining manufacture of the above-mentioned N-acetyl lactosamine, in preparative isolation by the above-mentioned activated carbon and cerite column, it is eluted in N-acetyl lactosamine with methanol 14 to 20%, and, thereby, N-acetyl lactosamine can be collected. And since the N-acetyl glucosamine collected by this invention method can be again used as a raw material of enzyme composition of N-acetyl lactosamine, it is dramatically useful, and the manufacturing method of such N-acetyl lactosamine constitutes one gestalt of this invention.

[0033]In performing this invention method combining manufacture of the above-mentioned N-acetyl lactosamine, Perform the enzyme synthetic reaction of N-acetyl lactosamine first, and with for example, the chromatography [reaction mixture] using strongly acidic cation exchange resin, gel filtration technique, activated carbon, a cerite column, etc. The monosaccharide fraction containing the fraction, N-acetyl glucosamine, and glucose of N-acetyl lactosamine can be isolated preparatively, respectively, glucose oxidase can be made to be able to act on this monosaccharide fraction, the generated gluconic acid can be removed, and N-acetyl glucosamines can be collected. However, this invention is not limited to this, may carry out separation removal of the N-acetyl lactosamine which is quality of an object from the end liquid of an enzyme synthetic reaction, for example, may apply this invention method to the mixture after this separation, and may apply this invention method to the solution of the non-fractionation after an enzyme reaction.

[0034]

[Example]Although an example explains this invention still more concretely, this invention is not limited to the following examples.

[0035]Purity measurement of N-acetyl glucosamine was performed on condition of the following using high performance chromatography (henceforth HPLC) among the example of the measuring method after-mentioned of reference example 1 N-acetyl glucosamine.

Column: P-Asahipak NH2 50 column (the Asahi Chemical make, 4.6 x 250 nm)

mobile phase: -- 70% acetonitrile solution rate-of-flow: -- a part for 0.7 ml/-- temperature: -- 37 ** detection: -- UV210 nm (absorption of N-acetyl group)

Differential refraction (sugars)

Sample: The retention time of the N-acetyl glucosamine by 5 ml, in addition this HPLC analysis method was 7.8 minutes.

[0036]Lipomyces lipofer which is yeast which has the screening lactose assimilation of reference example 2 enzyme source (IFO 0673),Rhodotorula minuta (IFO 0928), Rhodotorula lactosa (IFO 1423), Sterigmatomyces elviae (IFO 1843) (it purchases above from the Institute of Physical and Chemical Research microorganism preservation-of-line institution) was cultivated for six days in 28 ** by the Malt extract agar slant culture medium, and the preservation culture was produced.

[0037]the culture medium (lactose; -- 2% and peptone; -- 1%) which makes lactose the only carbon source Yeast extract; 1%, $(NH_4)_2SO_4$;0.5%, K_2HPO_4;0.3% and KH_2PO_4;0.1%, O; 0.05% of $MgSO_4$ and $7H_2$, and pH 7.0 [50-ml] were put into the Sakaguchi flask of 500 ml, and autoclave sterilization was carried out for 15 minutes at 121 **. One platinum loop of each above-mentioned preservation culture was inoculated into this, and it cultivated for four days at 28 **. Biomasses were collected with the centrifuge method after the end of culture, after tales doses of physiological salines to culture medium washed twice, biomasses were collected, and cryopreservation was carried out at -20 **.

[0038]The washing biomass prepared with the described method so that final concentration may be set to 500 mg/ml, 100 It was suspended to the substrate solution which dissolved lactose (made by Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), and N-acetyl glucosamine (made by Nacalai Tesque) in mM sodium acetate buffer solution (pH 6.0) so that it might be set to 0.5M and 1M, respectively, and was made to react at 60 ** for 17 hours. After heating the reaction supernatant liquor obtained by the centrifuge method after that in the boiling bath (for 5 minutes) and deactivating an enzyme, it diluted with distilled water to 1/10, and the resultant was analyzed by HPLC. A result is shown in Table 1. The result compounded by the method (JP,3-49692,A) of Usui and others was also indicated collectively.

[0039]

[Table 1]

各種酵母菌体及び *Bacillus circulans* 由来
β-ガラクトシダーゼによるN-アセチルラクトサミンの生産

酵母	ガラクトース転移物質生産量(mM)
	N-アセチルラクトサミン (L1)
Lipomyces lipofer	0.0
Rhodotorula minuta	129.0
Rhodotorula lactosa	126.4
Sterigmatomyces elviae	60.3
Bacillus circulans 由来 β-ガラクトシダーゼ	116.7

[0040]The washing biomass using yeast of a Rhodotorula group and a Sterigmatomyces group also produces N-acetyl lactosamine, When especially yeast of a Rhodotorula group was used, N-acetyl lactosamine productivity equivalent to the enzyme composition using Bacillus circulans origin **-galactosidase was obtained. Therefore, the washing biomass of Rhodotorulaminuta was used for the following experiments.

[0041]A recovery method of the N-acetyl glucosamine in the method of producing N-acetyl lactosamine continuously using an example 1 fixed-yeast biomass method[0042](1) Enzyme composition (fixed yeast biomass method)

The Rhodotorura minuta biomass prepared according to the reference example 2 was fixed with the calcium alginate in accordance with the conventional method (the edited by Society for fermentation and Bioengineering Japan, a biochemical engineering experiment document, the 2nd ** of the first edition, 316 (1993), Baifukan). It was suspended so that cell mass concentration might specifically be set to 500 mg/ml in the 2.8% sodium alginate solution cooled beforehand, and Pasteur pipette was used and dropped into the 0.5% calcium chloride aqueous solution which cooled this, and it was kept in the cool place one whole day and night.
[0043]the batch method (substrate: -- the lactose 0.5M.) using the immobilized cell (immobilized cell concentration 0.44 ml/ml) as preliminary experiment When the synthetic reaction of N-acetyl glucosamine 1.0M, reaction condition:pH 6.0, and N-acetyl lactosamine by 60 ** was performed, it checked that N-acetyl lactosamine of 60 mM was obtained in reaction mixture.
[0044]The glass column (1.6 x 10 cm) was filled up with the immobilized cell, and it was considered as the immobilized cell column. 100 The substrate solution which dissolved lactose and N-acetyl glucosamine in mM sodium acetate buffer solution (pH 6.0) so that it might be set to 0.5M and 1M, respectively was warmed at 60 **, said column was supplied in rate-of-flow 2 ml/time, and N-acetyl lactosamine synthetic reaction was performed continuously.
[0045]The reaction mixture (40 ml) which passed the above-mentioned immobilized cell column is applied to an activated carbon-cerite (1:1, Wako Pure Chem) column (8 x 13 cm), Triple the amount of the water of the column washed the column, and it was eluted by amount of fraction liquid;20 ml by rate-of-flow;0.82 ml/by the linear increase gradient method of methanol concentration using water (3000 ml) and 40% methanol (3000 ml).
[0046]The eluate fraction was determined by measuring UV absorption in 210 nm (absorption of an acetyl group). A result is shown in drawing 1. The monosaccharide fraction (glucose, N-acetyl glucosamine) and the peak 2 were used as the disaccharide fraction (N-acetyl lactosamine, N-ASECHIRUARO lactosamine), and the peak 3 (not shown) was used as the trisaccharide fraction (galactosyl N-acetyl lactosamine) for the peak 1. The fraction with the absorbance of 0.8 or more in 210 nm was pooled about the peak 1, and the N-acetyl glucosamine fraction containing glucose was obtained.
[0047]The obtained N-acetyl glucosamine fraction was freeze-dried, and 8.3-g snow-white powder was obtained. The purity assay by HPLC showed that this powder was the N-acetyl glucosamine of 78% of purity. The glucose content in the N-acetyl glucosamine fraction containing the glucose obtained here was about 22%.
[0048](2) The rough N-acetyl glucosamine obtained by refining (1) by Aspergillus niger origin glucose oxidase processing is dissolved in 100 mM sodium acetate buffer solution (pH 6.0), 100 mg/ml -- 10 ml preparation of the rough N-acetyl glucosamine solution was carried out. this -- Aspergillus niger origin glucose oxidase (the Kurabo Industries make.) Controlling the

pH of reaction mixture by an ammonia solution to pH 5.7-6.2 15%, after adding specific activity 156 unit / mg so that it may be set to final concentration 5 U/ml, the enzyme reaction was performed at 30 ** for 24 hours, and glucose was changed into gluconic acid. Presented the chromatography using anion exchange resin (MUROMAKKU 1x4 (a Cl^- type, 20 ml, Muromachi chemical industry)) with the obtained reaction mixture, gluconic acid was made to stick to this resin, the non-adsorbing fraction was freeze-dried, and the snow-white powder of 700 mg was obtained. This powder was the N-acetyl glucosamine of 95% of purity as a result of analysis by HPLC.

[0049]Example 2 The Rhodotorura minuta washing biomass (final concentration 500 mg/ml) prepared by the synthetic reference example 2 of N-acetyl lactosamine which uses the collected N-acetyl glucosamine,Lactose to 100mM sodium acetate buffer solution (pH 6.0) 0.5M, And the N-acetyl glucosamine fraction containing the glucose obtained in Example 1 (1), The refined N-acetyl glucosamine fraction which was obtained in Example 1 (2), Or enzyme composition of N-acetyl lactosamine was performed with the batch method using the substrate which dissolved so that it might be set to 1M as contrast by making one of commercial N-acetyl glucosamines (made by Nacalai Tesque) into N-acetyl glucosamine on the reaction temperature of 60 **, and the conditions of reaction-time 17 hours. A result is shown in Table 2.

[0050]

[Table 2]

回収されたN-アセチルグルコサミンによるN-アセチルラクトサミンの合成

N-アセチルグルコサミン	HPLC 純度 (%)	添加濃度 (mg/ml)	ガラクトース転移生成物の生成量(mM)		aL1/L1 比
			N-アセチルラクトサミン (L1)	N-アセチルアロラクトサミン (aL1)	
試薬	100.0	221.0	139.95	3.13	0.022
実施例 1(1)の回収品	80.0	276.3	78.33	2.61	0.033
実施例 1(2)の回収品	95.0	232.6	132.11	2.87	0.022

[0051]When the N-acetyl glucosamine fraction collected in Example 1 (2) was used, N-acetyl lactosamine quantity of production was almost equivalent to the case where commercial N-acetyl glucosamine is used. When the N-acetyl glucosamine fraction of Example 1 (1) collected without carrying out glucose oxidase processing is used, however, N-acetyl lactosamine quantity of production, It was halved compared with the case where commercial N-acetyl glucosamine is used, and the rate that N-ASECHIRUARO lactosamine which is a side reaction substance further is produced increased.

[0052]

[Effect of the Invention]By this invention, the N-acetyl glucosamine of a high grade with low glucose content is recoverable from the N-acetyl glucosamine in which glucose is intermingled at low cost simple. In manufacture by enzyme composition of N-acetyl lactosamine, by applying this invention method especially, It can become possible to reuse as a substrate the N-acetyl glucosamine which remains in post-reaction solution, the N-acetyl glucosamine which is an expensive raw material can be used without futility, and reduction of a manufacturing cost can be aimed at. The gluconic acid generated by glucose oxidase processing can also be used as drugs manufacturing raw materials.

[Claim(s)]

[Claim 1]It is the method of removing glucose from an N-acetyl glucosamine solution containing glucose, and collecting N-acetyl glucosamines, How carrying out separation removal of the glucose oxidase resultant from what processed said solution by glucose oxidase and processed it in this way.

[Claim 2]A way according to claim 1 said solution is the reaction mixture obtained in enzyme composition of N-acetyl lactosamine using lactose and N-acetyl glucosamine as a substrate.

[Claim 3]A way according to claim 2 a reaction mixture obtained in enzyme composition of N-acetyl lactosamine is a mixture which carried out separation removal of the N-acetyl lactosamine at least after an enzyme synthetic reaction.

[Claim 4]A way according to claim 2 said solution is the monosaccharide fraction obtained from a reaction mixture obtained in enzyme composition of N-acetyl lactosamine.

[Claim 5]A way according to any one of claims 1 to 4 glucose oxidase is the glucose oxidase from microorganism belonging to an Aspergillus group or a Penicillium group.

[Claim 6]A way according to any one of claims 1 to 4 glucose oxidase originates in Aspergillus niger.

[Claim 7]A method of changing glucose into gluconic acid, carrying out separation removal of the gluconic acid from this treating solution by anion-exchange-resin processing, and collecting N-acetyl glucosamines by carrying out glucose oxidase processing of said solution, according to any one of claims 1 to 6.

[Claim 8]After an enzyme synthetic reaction of N-acetyl lactosamine using lactose and N-acetyl glucosamine as a substrate, Glucose is changed into gluconic acid by carrying out glucose oxidase processing to a monosaccharide fraction containing N-acetyl glucosamine and glucose which were obtained by carrying out activated carbon treatment of the reaction mixture, How to carry out separation removal of the gluconic acid from a solution by anion-exchange-resin processing furthermore, and to collect N-acetyl glucosamines.

[Claim 9]A way according to any one of claims 1 to 8 purity of N-acetyl glucosamine obtained is not less than 90%.

[Claim 10]N-acetyl glucosamine and lactose which were obtained by a method indicated to either of claims 1-9, A manufacturing method of N-acetyl lactosamine making it react under existence of an enzyme which has the operation which transfers galactose residue to N-acetyl glucosamine from lactose, and generates N-acetyl lactosamine.

(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公開特許公報**（Ａ）

(11)特許出願公開番号
特開2001－292792
（P2001－292792A）

(43)公開日　平成13年10月23日(2001.10.23)

(51)Int.Cl.^{7}	識別記号	ＦＩ		テーマコード(参考)
Ｃ１２Ｐ　19/26		Ｃ１２Ｐ　19/26		４Ｂ０６４
Ｂ０１Ｄ　15/08		Ｂ０１Ｄ　15/08		４Ｄ０１７
Ｂ０１Ｊ　20/26		Ｂ０１Ｊ　20/26	Ｇ	４Ｇ０６６
			Ｌ	
//（Ｃ１２Ｐ　19/26		（Ｃ１２Ｐ　19/26		

審査請求　未請求　請求項の数10　ＯＬ　（全　８　頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000－112406(P2000－112406)

(22)出願日　平成12年４月13日(2000.4.13)

(71)出願人　000195524
生化学工業株式会社
東京都中央区日本橋本町２丁目１番５号

(72)発明者　鈴木　喜義
東京都立川市若葉町１－13－２　けやき台団地２－510

(72)発明者　舘林　定雄
東京都あきる野市引田482－３

(74)代理人　100099852
弁理士　多田　公子　（外１名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｎ－アセチルグルコサミンの回収方法

(57)【要約】

【課題】　グルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液からN-アセチルグルコサミンを回収する方法であって、N-アセチルグルコサミンを原料として用いる工業規模での物質合成に使用できるグルコース含有率の低いN-アセチルグルコサミンを簡便に回収できる方法を提供する。回収されたＮ-アセチルグルコサミンを再利用することによりコスト削減が可能となり、しかも環境に対し有益である。

【解決手段】　グルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液からグルコースを除去してＮ-アセチルグルコサミンを回収する方法であって、前記溶液をグルコースオキシダーゼで処理してこのように処理したものからグルコースオキシダーゼ反応生成物を分離除去することを特徴とする方法。

【特許請求の範囲】

【請求項１】　グルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液からグルコースを除去してN-アセチルグルコサミンを回収する方法であって、前記溶液をグルコースオキシダーゼで処理し、このように処理したものからグルコースオキシダーゼ反応生成物を分離除去することを特徴とする方法。

【請求項２】　前記溶液が、ラクトース及びN-アセチルグルコサミンを基質として用いるN-アセチルラクトサミンの酵素合成において得られた反応混合物である請求項１に記載の方法。

【請求項３】　N-アセチルラクトサミンの酵素合成において得られた反応混合物が、酵素合成反応後、少なくともN-アセチルラクトサミンを分離除去した混合物である請求項２に記載の方法。

【請求項４】　前記溶液が、N-アセチルラクトサミンの酵素合成において得られた反応混合物より得られた単糖画分である請求項２に記載の方法。

【請求項５】　グルコースオキシダーゼが、Aspergillus属又はPenicillium属に属する微生物由来のグルコースオキシダーゼである請求項１～４のいずれかに記載の方法。

【請求項６】　グルコースオキシダーゼがAspergillus nigerに由来する請求項１～４のいずれかに記載の方法。

【請求項７】　前記溶液をグルコースオキシダーゼ処理することによりグルコースをグルコン酸に変換し、陰イオン交換樹脂処理により該処理溶液からグルコン酸を分離除去してN-アセチルグルコサミンを回収することを特徴とする請求項１～６のいずれかに記載の方法。

【請求項８】　ラクトースとN-アセチルグルコサミンを基質として用いるN-アセチルラクトサミンの酵素合成反応後、反応混合物を活性炭処理し、得られたN-アセチルグルコサミン及びグルコースを含む単糖画分に対しグルコースオキシダーゼ処理することによりグルコースをグルコン酸に変換し、さらに陰イオン交換樹脂処理により溶液からグルコン酸を分離除去してN-アセチルグルコサミンを回収する方法。

【請求項９】　得られるN-アセチルグルコサミンの純度が９０％以上である請求項１～８のいずれかに記載の方法。

【請求項１０】　請求項１～９のいずれかに記載された方法によって得られたN-アセチルグルコサミンとラクトースとを、ラクトースからガラクトース残基をN-アセチルグルコサミンに転移してN-アセチルラクトサミンを生成する作用を有する酵素の存在下において反応させることを特徴とするN-アセチルラクトサミンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、グルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液からN-アセチルグルコサミンを回収する方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】N-アセチルグルコサミンは、動植物や微生物の複合糖質、特にキチン、グリコサミノグリカン、糖タンパク質、糖脂質等の構成成分として広く分布している。

【０００３】N-アセチルグルコサミンはN-アセチルラクトサミンの合成原料として用いられている。N-アセチルラクトサミンは、人乳オリゴ糖やリポ多糖、各種糖タンパク質及び糖脂質の糖鎖中に存在する生化学的に非常に重要な二糖であり、腸内細菌の一種であるビフィズス菌の増殖活性を有しており、優れた整腸作用を示すことから、育児用調製粉乳のような高度栄養食品への利用が注目されている。さらに近年、N-アセチルラクトサミンを含む複合糖質糖鎖の生理活性にも注目が集まっており、例えば、細胞接着阻害活性を有するシアリルLe^x糖鎖などの合成原料として注目されている。

【０００４】このN-アセチルラクトサミンを合成する方法としては、化学合成法と酵素合成法が知られているが、一段階の反応で目的物質が得られることから、工業規模での合成法としては専らβ-ガラクトシダーゼ又はガラクトシルトランスフェラーゼを使用する酵素合成法の研究が広くなされている。このうち、β-ガラクトシダーゼを使用する酵素合成法の多くは、反応原料としてN-アセチルグルコサミンとラクトースを含有する基質を用いている方法である。この基質を用いた酵素反応終了後の反応液中には、生成したN-アセチルラクトサミンと共に未反応のN-アセチルグルコサミンや未反応のラクトース、それにグルコース等の反応副生成物が存在している。この反応液からN-アセチルグルコサミンを効率よく回収し、反応原料として再利用することは、環境対策や工業規模でのN-アセチルラクトサミン製造のコスト削減のために望まれている。

【０００５】また、グルコースはβ-ガラクトシダーゼのガラクトース転移活性を阻害する作用を示すことが知られており、回収したN-アセチルグルコサミンをN-アセチルラクトサミン製造に再利用するには、可能な限りグルコース含有率の低い、高純度なN-アセチルグルコサミンを得る必要がある。

【０００６】しかしながら、従来用いられている活性炭・セライトカラム等の工業的規模で利用可能なクロマトグラフィーでは、単糖同士であるN-アセチルグルコサミンとグルコースを分離することは困難であり、実際に、上記N-アセチルラクトサミン製造により得られた反応液から活性炭・セライトカラムにより分画したN-アセチルグルコサミン画分には、約２０％のグルコースが含まれている。このグルコースをさらに除去し、上記N-アセチルラクトサミンの酵素合成等に再利用可能な

程度にグルコース含有率の低いN-アセチルグルコサミンを得るためには、より煩雑な精製操作や高価な精製材料を必要とする。

【０００７】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明は、グルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液からN-アセチルグルコサミンを回収する方法であって、N-アセチルグルコサミンを原料として用いる工業規模での物質合成に使用可能なグルコース含有率の低いN-アセチルグルコサミンを、簡便に、かつ低いコストで回収でき、しかも環境に対し有益な方法を提供することを目的とする。

【０００８】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意研究を重ねた結果、グルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液に、グルコースオキシダーゼを作用させ選択的にグルコースをグルコン酸に変換すると、通常用いられる分離方法を用いて、簡単に高純度なN-アセチルグルコサミンが得られることを見出し、本発明を完成するに到った。

【０００９】従って本発明は、グルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液からグルコースを除去してN-アセチルグルコサミンを回収する方法であって、前記溶液をグルコースオキシダーゼで処理して、このように処理したものからグルコースオキシダーゼ反応生成物を分離除去することを特徴とする方法を提供する。

【００１０】上記本発明の方法に用いられるグルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液としては、ラクトース及びN-アセチルグルコサミンを基質として用いるN-アセチルラクトサミンの酵素合成において得られた反応混合物を好ましく用いることができる。

【００１１】上記N-アセチルラクトサミンの酵素合成において得られた反応混合物からN-アセチルグルコサミンを回収する場合、該反応混合物は、酵素合成反応後、少なくともN-アセチルラクトサミンが分離除去されていることが好ましく、酵素合成反応後に分取した単糖類からなる画分であることが最も好ましい。

【００１２】上記本発明の方法に用いられるグルコースオキシダーゼとしては、Aspergillus属又はPenicillium属に属する微生物由来のグルコースオキシダーゼを好ましく使用することができ、特にAspergillus nigerに由来するグルコースオキシダーゼを好ましく使用することができる。

【００１３】上記本発明方法においては、前記溶液をグルコースオキシダーゼ処理することによりグルコースをグルコン酸に変換し、陰イオン交換樹脂処理により該処理溶液からグルコン酸を分離除去してN-アセチルグルコサミンを回収することが好ましい。

【００１４】上記グルコースをグルコン酸に変換し、陰イオン交換樹脂処理により溶液からグルコン酸を分離除去してN-アセチルグルコサミンを回収する本発明方法においては、純度が９０%以上のN-アセチルグルコサミンを得ることができる。

【００１５】また本発明の別の形態として、上記本発明方法により得られたN-アセチルグルコサミンとラクトースとをβ-ガラクトシダーゼ存在下において反応させることを特徴とするN-アセチルラクトサミンの製造方法が提供される。

【００１６】さらに、N-アセチルグルコサミンとラクトースとを、ラクトースからガラクトース残基をN-アセチルグルコサミンに転移してN-アセチルラクトサミンを生成する作用を有する酵素の存在下において反応させて、該反応混合物を活性炭処理することによりN-アセチルグルコサミン及びグルコースを含有する単糖画分を得、該画分をグルコースオキシダーゼ処理し、生成したグルコン酸を分離除去してN-アセチルグルコサミンを得る方法が提供でき、これにより得られたN-アセチルグルコサミンを含む溶液にラクトースを添加して上記N-アセチルラクトサミン合成反応に供することを特徴とするN-アセチルラクトサミンの製造法が提供される。

【００１７】

【発明の実施の形態】以下に本発明をさらに詳細に説明する。本発明の方法に使用されるグルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液は、少なくとも両者を含有する溶液であればよく、溶液の製造方法や由来は特に限定されない。このような溶液は、N-アセチルグルコサミンをグルコースより多く含む溶液であることが好ましい。

【００１８】このような溶液としては、例えば、ラクトースとN-アセチルグルコサミンを基質とする酵素合成によるN-アセチルラクトサミンの製造において得られる反応混合物を挙げることができる。この反応混合物とは、該酵素合成によるN-アセチルラクトサミンの製造において得られるのであれば限定されない。通常、溶液だが、溶液から溶媒を除去した固体状のものでも良い。この酵素合成によるN-アセチルラクトサミンの製造においては、具体的には、ラクトースとN-アセチルグルコサミンを含有する基質溶液に、ラクトースからガラクトース残基をN-アセチルグルコサミンに転移する作用を有する酵素を作用させ、N-アセチルラクトサミンを合成する。反応終了後、通常、イオンクロマトグラフィー法やゲル沪過分離法等により、N-アセチルラクトサミンを分別除去した溶液を得たり、単糖画分のみを分取することにより、N-アセチルグルコサミンとグルコースを含有する溶液を得ることができる。このような単糖画分は通常７０～９０モル%程度のN-アセチルグルコサミンと１０～３０モル%程度のグルコースを含んでいる。

【００１９】上記N-アセチルラクトサミンの酵素合成において用いる、ラクトースからガラクトース残基をN-アセチルグルコサミンに転移する作用を有する酵素とし

ては、そのような触媒作用を有するものであれば、その存在形態や由来は限定されるものではなく、例えば精製酵素、部分精製酵素等のいわゆる酵素そのものだけではなく、該酵素を含有する静止菌体、乾燥菌体、菌体破砕物なども本発明における酵素の範疇である。このような酵素として具体的には、Bacillus circulans等のBacillus属微生物、Rhodotorula minutaやRhodotorula lactosa等のRhodotorula属微生物、Sterigmatomyces elviae等のSterigmatomyces属微生物に由来するβ-ガラクトシダーゼの精製酵素もしくは部分精製酵素又は酵素調製物が挙げられるが、特に、Bacillus circulans由来のβ-1,4グリコシド結合に対する特異性の高いβ-ガラクトシダーゼが好ましい。

【００２０】前記酵素は、前記酵素生産能を有する微生物等の天然物から抽出・精製されたものであってもよく、あるいは前記酵素をコードする遺伝子ＤＮＡを導入した組換え細胞等を生育させ、抽出、精製するなどの遺伝子工学的手法により製造したものであってもよい。さらに、前記酵素は、ガラクトース転移反応を有する酵素の活性部位を含むポリペプチドであってもよく、このようなポリペプチドは遺伝子工学的手法により製造できる。

【００２１】上記酵素合成反応の条件は特に限定されることはなく、用いる合成酵素の反応条件として公知の条件に従って行うことができ、当業者が適宜選択することができるが、用いる酵素の至適pH及び至適温度条件下で反応を行うことが好ましい。基質を含有する溶液等の基質混合物に関しても、用いる酵素による反応に影響を与えない限り限定されないが、緩衝液中の混合物であることが好ましい。

【００２２】反応形態としては、酵素反応の常套的手段が採用でき、酵素反応が進行する状態で基質と酵素を作用させればよい。例えば、基質溶液に酵素を接触させてもよく、またその逆でもよく、用いるこのような酵素を適当な担体に固定して、基質溶液を接触させる方法も採用し得る。より具体的には、例えば、用いる酵素をビーズ状の担体に固定化してカラムに充填し、ラクトースとN-アセチルグルコサミンの混合物を通しながら連続して合成を行うことも可能である。また、基質溶液に固定化酵素を添加し、撹拌等により両者を十分に接触反応させ、反応後に固定化酵素を分離する等のバッチ法も採用できる。

【００２３】このようにして得られた反応混合物には、前記酵素による反応の目的物質であるN-アセチルラクトサミンの他、未反応の基質であるN-アセチルグルコサミン、ラクトース、副生成物であるグルコース、ガラクトシル-N-アセチルラクトサミン等が含まれている。

【００２４】この反応混合物から単糖画分を分取する方法は、単糖画分を分取できる方法であれば特に限定されない。例えば、必要に応じて粉炭やイオン交換樹脂による脱色・脱塩処理などの予備精製を反応混合物に施し、成分の濃度が低い場合には、さらに減圧下で濃縮する等の処理をしてから、強酸性陽イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィーによる分離法、ゲル沪過分離法、分子ふるい法、活性炭・セライト（商品名）カラム等の吸着剤を用いる吸着クロマトグラフィー法等の公知の方法によって単糖画分を容易に分取することができる。

【００２５】一例として、活性炭・セライトカラムによる分取方法をさらに詳細に説明する。カラム容量の２～６％（W/V）の前記合成反応混合物をカラムに供給し、流速６０～２００ ml/時間で溶出液を流し、糖類を溶出させる。N-アセチルグルコサミンやグルコースを含有する単糖画分は、水により溶出される。カラムに供給する合成反応終了混合物の糖濃度は、20～65%（w/w）程度が適当で、これよりも濃度が高いと分離パターンに乱れを生じる。また、上記方法において、１４～２０％メタノールによりN-アセチルラクトサミンが溶出するので、N-アセチルラクトサミンを分離することも可能である。

【００２６】グルコースを含有するN-アセチルグルコサミン溶液からグルコースを除去しN-アセチルグルコサミンを回収するために用いるグルコースオキシダーゼとしては、グルコースをグルコン酸に変換する作用を有すると共に、N-アセチルグルコサミンに実質的に影響を及ぼさない酵素（ここで酵素とは、精製酵素、部分精製酵素等の酵素そのものほか、該酵素を含有する静止菌体、乾燥菌体、菌体破砕物なども含む概念である）であれば、その由来は特に限定されない。例えば、Aspergillus niger等のAspergillus属由来のものや、Penicillium notatum等のPenicillium属由来のものが挙げられる。特にAspergillus niger由来のものが好ましい。

【００２７】この酵素は、グルコースをグルコン酸に変換する作用を有する酵素の生産能を有する微生物等の天然物から抽出・精製されたものであってもよく、このような酵素をコードする遺伝子ＤＮＡを導入した組換え細胞等を生育させ、抽出・精製するなどの遺伝子工学的手法により製造されたものであってもよい。さらに、グルコースをグルコン酸に変換する作用を有し、N-アセチルグルコサミンに実質的に影響を及ぼさないものであれば、グルコースオキシダーゼの活性部位を含むポリペプチドでもよく、このようなポリペプチドは遺伝子工学的手法により製造できる。

【００２８】グルコースオキシダーゼ処理を行う条件は、グルコースをグルコン酸に変換する反応を妨げないと共に、N-アセチルグルコサミンに実質的に影響を及ぼさない限り限定されず、当業者が適宜選択することができるが、用いるグルコースオキシダーゼの至適pH及び至適温度条件下で反応させることが好ましい。Aspergillus niger由来のグルコースオキシダーゼを用いる場合は、ｐＨ 5.7～6.2、30℃程度で反応を行うことが好まし

い。

【００２９】グルコースオキシダーゼによる処理後、この処理物を酵素法によるN-アセチルラクトサミンの生成反応における基質であるN-アセチルグルコサミンの供給源として使用することができる。通常、このN-アセチルグルコサミンを含有する該処理物からグルコースオキシダーゼによる反応生成物であるグルコン酸を公知慣用の方法によって分離除去する。

【００３０】尚、一般にグルコン酸は、水溶液中ではグルコノ-1,4-ラクトン、グルコノ-1,5-ラクトン及び遊離のグルコン酸の平衡混合物として存在することが知られており、本発明においても、グルコースオキシダーゼにより生成したグルコン酸は水溶液中でグルコノ-1,4-ラクトン、グルコノ-1,5-ラクトン及び遊離のグルコン酸の平衡混合物として存在している，従って、本発明においては、「グルコン酸」とは、グルコン酸そのもの以外に、この様なグルコノラクトンも包含する用語として使用するものとし、前記の分離・除去法はグルコノラクトンも除去可能な方法であることが好ましい。

【００３１】グルコースオキシダーゼ処理後の溶液から、グルコン酸（グルコノラクトン）を分離除去し、N-アセチルグルコサミンを分取する方法は、N-アセチルグルコサミンが得られる方法であれば特に限定されない。例えば、ムロマックCl$^-$型（室町化学工業、4級アンモニウム基を有するスチレン系強塩基性樹脂）や、ダイヤイオンＳＡ１０Ａもしくは１１Ａ等のＳＡシリーズ又はＰＡシリーズ（三菱化学、4級アンモニウム基を有するスチレン系強塩基性樹脂）のような陰イオン交換樹脂を用いたクロマトグラフィーや、電気透析法があるが、特に陰イオン交換樹脂を用いたクロマトグラフィーによりグルコン酸を吸着除去し、非吸着画分であるN-アセチルグルコサミンを得る方法が簡便で好ましい。

【００３２】本発明方法により、純度９０％以上、好ましくは９５％以上のN-アセチルグルコサミンが得られ＊

＊る。本発明方法を上記N-アセチルラクトサミンの製造と組合せて行う場合、上記活性炭・セライトカラムによる分取においては、14～20%メタノールによりN-アセチルラクトサミンが溶出され、これによりN-アセチルラクトサミンが回収できる。そして本発明方法により回収されたN-アセチルグルコサミンはN-アセチルラクトサミンの酵素合成の原料として再び利用できるので非常に有益であり、このようなN-アセチルラクトサミンの製造方法は本発明の1つの形態を構成する。

【００３３】なお、本発明方法を上記N-アセチルラクトサミンの製造と組合せて行う場合には、例えば、先ずN-アセチルラクトサミンの酵素合成反応を行い、反応混合物を強酸性陽イオン交換樹脂を用いるクロマトグラフィーや、ゲル沪過法、活性炭・セライトカラム等により、N-アセチルラクトサミンの画分、N-アセチルグルコサミン及びグルコースを含む単糖画分をそれぞれ分取し、該単糖画分にグルコースオキシダーゼを作用させ、生成したグルコン酸を除去し、N-アセチルグルコサミンを回収することができる。但し本発明はこれに限定されるものではなく、例えば、酵素合成反応終了液から目的物質であるN-アセチルラクトサミンを分離除去し、この分離後の混合物に本発明方法を適用してもよいし、酵素反応後の未分画の溶液に本発明方法を適用してもよい。

【００３４】

【実施例】本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【００３５】参考例１

N-アセチルグルコサミンの測定方法

後述の実施例中、N-アセチルグルコサミンの純度測定は、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCという）を用い、下記の条件で行った。

カラム：Asahipak NH2P-50カラム（旭化成製、4.6 x 250 mm）
移動相：70%アセトニトリル水溶液
流速：0.7 ml/分
温度：37℃
検出：UV210 nm （N-アセチル基の吸収）
　　　示差屈折（糖類）
試料：5 ml

尚、本HPLC分析法によるN-アセチルグルコサミンのリテンションタイムは、7.8分であった。

【００３６】参考例２

酵素源のスクリーニング

ラクトース資化性を有する酵母であるLipomyces lipofer（IFO 0673）、Rhodotorula minuta（IFO 0928）、Rhodotorula lactosa(IFO 1423)、Sterigmatomyces elviae（IFO 1843）（以上、理化学研究所微生物系統保存施設より購入）をマルツエキス寒天スラント培地で２８℃にお※

※いて６日間培養し、保存カルチャーを作製した。

【００３７】ラクトースを唯一の炭素源とする培地（ラクトース；2%、ペプトン；1%、酵母エキス：1%、$(NH_4)_2SO_4$；0.5%、K_2HPO_4；0.3%、KH_2PO_4；0.1%、$MgSO_4\cdot7H_2O$；0.05%、pH 7.0）を５００ mlの坂口フラスコに５０ ml入れ、121℃で１５分間オートクレーブ滅菌した。これに上記各保存カルチャーを１白金耳接種し、２８℃で４日間培養した。培養終了後、遠心分離法により菌体を集め、培養液と同量の生理食塩水で２回洗浄した後菌体

を集め、−２０℃で凍結保存した。

【００３８】上記方法にて調製した洗浄菌体を、終濃度が500 mg/mlになるように、100 mM酢酸ナトリウム緩衝溶液（pH 6.0）にラクトース（和光純薬工業（株）製）とN-アセチルグルコサミン（ナカライテスク製）をそれぞれ０.５Ｍと１Ｍになるように溶解した基質溶液に懸濁し、６０℃で１７時間反応させた。その後遠心分離法によって得られた反応上清液を煮沸浴中（５分間）で加熱して酵素を失活させた後、蒸留水で1/10に希釈し、HPLCで反応生成物の分析を行った。結果を表１に示す。碓氷らの方法（特開平３−４９６９２号公報）で合成した結果も併せて記載した。

【００３９】

【表１】

各種酵母菌体及び *Bacillus circulans* 由来
β-ガラクトシダーゼによるN-アセチルラクトサミンの生産

酵母	ガラクトース転移物質生産量(mM)
	N-アセチルラクトサミン（L1）
Lipomyces lipofer	0.0
Rhodotorula minuta	129.0
Rhodotorula lactosa	126.4
Sterigmatomyces elviae	60.3
Bacillus circulans 由来 β-ガラクトシダーゼ	116.7

【００４０】Rhodotorula属や、Sterigmatomyces属の酵母を用いた洗浄菌体もN-アセチルラクトサミンを生産し、特にRhodotorula属の酵母を用いた場合、Bacillus circulans由来β-ガラクトシダーゼを用いた酵素合成と同等のN-アセチルラクトサミン生産性が得られた。よって以下の実験にはRhodotorula minutaの洗浄菌体を使用した。

【００４１】実施例１

固定化酵母菌体法を用いたN-アセチルラクトサミンの連続生産法におけるN-アセチルグルコサミンの回収方法

【００４２】（１）酵素合成（固定化酵母菌体法）

参考例２に従い調製したRhodotorura minuta菌体を常法（日本生物工学会編、生物化学工学実験書、初版第２刷、316（1993）、培風館）に従ってアルギン酸カルシウムで固定化した。具体的には、あらかじめ冷却した2.8%アルギン酸ナトリウム水溶液に菌体濃度が500 mg/mlになるように懸濁し、これを冷却した0.5%塩化カルシウム水溶液中にパスツールピペットを用いて滴下し、冷暗所に一昼夜保管した。

【００４３】予備実験として、固定化菌体（固定化菌体濃度0.44 ml/ml）を用いたバッチ法（基質：ラクトース0.5M、N-アセチルグルコサミン1.0M、反応条件：pH 6.0、60℃）によるN-アセチルラクトサミンの合成反応を行ったところ、60 mMのN-アセチルラクトサミンが反応液中に得られることを確認した。

【００４４】固定化菌体をガラスカラム（1.6 x 10 cm）に充填し、固定化菌体カラムとした。100 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）にラクトースとN-アセチルグルコサミンをそれぞれ0.5Mと1Mになるように溶解した基質溶液を60℃に加温し、前記カラムに流速2 ml/時間で供給し、連続的にN-アセチルラクトサミン合成反応を行った。

【００４５】上記固定化菌体カラムを通過した反応液（40 ml）を活性炭-セライト（1:1、和光純薬）カラム（8 x 13 cm）にかけ、カラムの３倍量の水でカラムを洗浄し、水（3000 ml）と40%メタノール（3000 ml）を用いたメタノール濃度の直線的増加グラディエント法により、流速；0.82 ml/分、分画液量；20 mlで溶出した。

【００４６】溶出画分は、210 nm（アセチル基の吸収）におけるUV吸収を測定することにより決定した。結果を図1に示す。ピーク１を単糖画分（グルコース、N-アセチルグルコサミン）、ピーク２を二糖画分（N-アセチルラクトサミン、N-アセチルアロラクトサミン）、ピーク３(図示しない)を三糖画分（ガラクトシル-N-アセチルラクトサミン）とした。ピーク１に関して、210 nmにおける吸光度が０．８以上あるフラクションをプールし、グルコースを含むN-アセチルグルコサミン画分を得た。

【００４７】得られたN-アセチルグルコサミン画分を凍結乾燥し、８．３gの純白粉末を得た。HPLCによる純度検定によりこの粉末は純度78%のN-アセチルグルコサミンであることが判った。尚、ここで得たグルコースを含むN-アセチルグルコサミン画分中のグルコース含有量は、約22%であった。

【００４８】（２）Aspergillus niger由来グルコースオキシダーゼ処理による精製

（１）で得られた粗N-アセチルグルコサミンを100 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）に溶解し、100 mg/ml粗N-アセチルグルコサミン水溶液を10 ml調製した。これにAspergillus niger由来グルコースオキシダーゼ

（クラボウ製、比活性156ユニット/mg）を終濃度５ U/mlになるように添加した後、反応液のpHを１５％アンモニア水でpH 5.7～6.2に制御しながら、30℃で２４時間酵素反応を行い、グルコースをグルコン酸に変換した。得られた反応液を陰イオン交換樹脂（ムロマック1×4（Cl⁻ 型、20 ml、室町化学工業））を用いたクロマトグラフィーに供し、グルコン酸を該樹脂に吸着させ、非吸着画分を凍結乾燥し、700 mgの純白の粉末を得た。HPLCによる分析の結果、この粉末は純度９５％のN-アセチルグルコサミンであった。

【００４９】実施例２

回収されたN-アセチルグルコサミンを使用したN-アセチルラクトサミンの合成参考例２で調製したRhodotorula minuta洗浄菌体（終濃度500 mg/ml）と、100mM酢酸ナトリウム緩衝溶液（pH6.0）にラクトースを０.５Ｍ、及び実施例１（１）で得たグルコースを含有するN-アセチルグルコサミン画分、実施例１（２）にて得た精製されたN-アセチルグルコサミン画分、又は対照として市販のN-アセチルグルコサミン（ナカライテスク製）いずれかをN-アセチルグルコサミンとして１Ｍとなるように溶解した基質を用い、反応温度６０℃、反応時間１７時間の条件でバッチ法によりN-アセチルラクトサミンの酵素合成を行った。結果を表２に示す。

【００５０】

【表２】

回収されたN-アセチルグルコサミンによるN-アセチルラクトサミンの合成

N-アセチルグルコサミン	HPLC 純度 (%)	添加濃度 (mg/ml)	ガラクトース転移生成物の生成量(mM)		aL1/L1 比
			N-アセチルラクトサミン (L1)	N-アセチルアロラクトサミン (aL1)	
試薬	100.0	221.0	139.95	3.13	0.022
実施例1(1)の回収品	80.0	276.3	78.33	2.61	0.033
実施例1(2)の回収品	95.0	232.6	132.11	2.87	0.022

【００５１】実施例１（２）で回収したN-アセチルグルコサミン画分を用いたときのN-アセチルラクトサミン生産量は、市販のN-アセチルグルコサミンを用いた場合とほぼ同等であった。しかし、グルコースオキシダーゼ処理をせずに回収した実施例１（１）のN-アセチルグルコサミン画分を用いたときのN-アセチルラクトサミン生産量は、市販のN-アセチルグルコサミンを用いた場合に比べると半減し、さらに副反応物質であるN-アセチルアロラクトサミンが生産される割合が増加した。

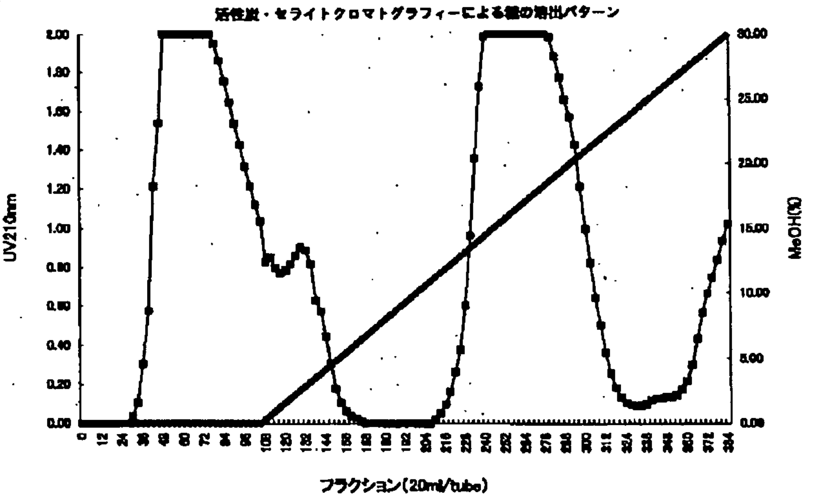
【００５２】

【発明の効果】本発明により、グルコースが混在するN-アセチルグルコサミンからグルコース含有率の低い高純度のN-アセチルグルコサミンを、簡便に、かつ低いコストで回収できる。特にN-アセチルラクトサミンの酵素合成による製造において、本発明方法を適用することにより、反応終了液に残存しているN-アセチルグルコサミンを基質として再利用することが可能となり、高価な原料であるN-アセチルグルコサミンを無駄なく使用でき、製造コストの削減を図ることができる。グルコースオキシダーゼ処理により生成したグルコン酸は、医薬品製造原料として利用することもできる。

【図面の簡単な説明】

【図１】　固定化菌体法によるN-アセチルラクトサミンの連続的製造において得られる混合物についての活性炭クロマトグラフィーにおける糖の溶出パターンを示す図である。

【図１】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷	識別記号	ＦＩ	ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
Ｃ１２Ｒ　1:685)		Ｃ１２Ｒ　1:685)	
(Ｃ１２Ｐ　19/26		(Ｃ１２Ｐ　19/26	
Ｃ１２Ｒ　1:80)		Ｃ１２Ｒ　1:80)	

Ｆターム(参考)　4B064 AE01 AF03 CA05 CA06 CA21
CA36 CB11 CB30 CE09 CE10
CE20 DA16
4D017 AA07 BA04 CA13 CA17 DA03
EB03
4G066 AC14B AD06B AE10B CA56
DA07 EA01